

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-130023

(43)Date of publication of application : 13.05.1994

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/28

(21)Application number : 04-278828

(71)Applicant : SUMITOMO METAL IND LTD

(22)Date of filing : 16.10.1992

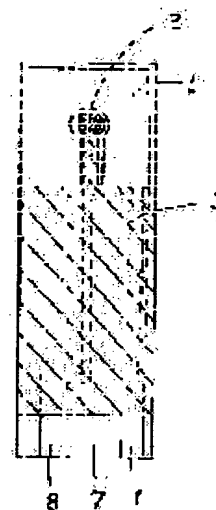
(72)Inventor : KISHIMOTO YOSHIHISA

(54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To measure even a sample in a very small amount with good accuracy and to reduce an error by a disturbing substance such as a protein or the like by a method wherein a filtrate layer and/or a liquid-holding layer are formed on a measuring electrode or on an electrode system including the measuring electrode.

CONSTITUTION: A copper-clad glass substrate 1 is etched, and a measuring electrode 3 and a counter electrode 2 are formed. The measuring pole 3 or the measuring pole 3 and the counter electrode 2 are covered with a filtrate layer and/or a liquid-holding layer. When the liquid-holding layer is formed, an influence by a flow rate is reduced and even a sample in an extremely small amount can be measured. In addition, when the filtrate layer is formed, it is possible to reduce an error by a disturbing substance in a living-body sample. In addition, since blood whose viscosity is high is made to reach an enzyme-fixing film and it is measured quickly, an anti-blood coagulant is carried and held in at least one layer out of the filtrate layer and the liquid-holding layer. In addition, a compensation electrode to which an enzyme is not fixed is formed, an influence by the adsorption of a protein or the like in a sample or by a subreaction is removed and a higher accuracy measurement can be performed.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-130023

(43)公開日 平成6年(1994)5月13日

(51)Int.Cl.⁵

G 0 1 N 27/327
27/28

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

3 3 1 Z 7235-2 J
7235-2 J
7235-2 J
7235-2 J

G 0 1 N 27/ 30 3 5 3 R
3 5 3 B
3 5 3 J

審査請求 未請求 請求項の数4(全 9 頁)

(21)出願番号

特願平4-278828

(22)出願日

平成4年(1992)10月16日

(71)出願人 000002118

住友金属工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 岸本 芳久

大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友金
属工業株式会社内

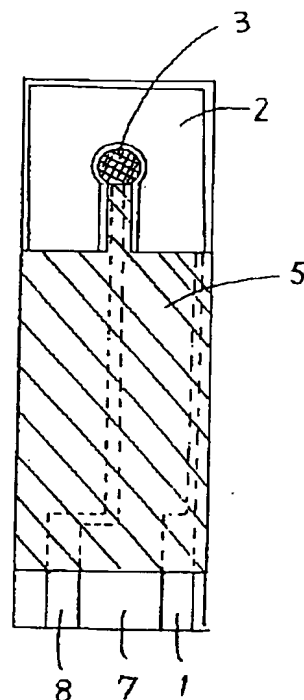
(74)代理人 弁理士 広瀬 章一

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【構成】 有機電荷移動錯体結晶を含有する酵素固定化電極である測定極と対極からなるバイオセンサにおいて、少なくとも測定極上に濾液層および／または保液層を設ける。必要によりこれらの層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させる。

【効果】 液量の多少に影響されず微量の試料でも測定でき、また、生体試料に含まれる蛋白質や血球成分等の妨害を受けることなく、高濃度基質まで良好な応答性を示す。高精度の測定を簡便に行える。抗血凝固剤により全血等の生体試料であっても迅速、高精度に測定しうる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機電荷移動錯体結晶を導電層として含む電極に酵素および電子メディエーターを固定化した測定極と、その近傍に設けた対極とからなる電極系を有するバイオセンサにおいて、測定極上あるいは測定極を含む電極系上に濾液層および／または保液層を設けたことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 濾液層および／または保液層中に抗血凝固剤を担持させた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 さらに、酵素が固定化されていない補償極を設けた請求項1または2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 酵素が酸化還元酵素である請求項1ないし3のいずれかに記載の酵素電極。

【発明の詳細な説明】

【0001】

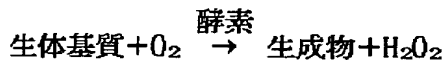
【産業上の利用分野】本発明はバイオセンサ、特に、血液、尿等の体液成分中に含まれる微量の生体基質の濃度を測定するのに好適な酵素センサに関する。

【0002】

【従来の技術】酵素の優れた基質特異性を利用した分析法が、臨床分析化学、食品製造、環境化学等の分野で用いられている。特に、臨床分析化学の分野では、グルコース、尿素、尿酸等の生体基質を選択的に検出する酵素センサが開発されている。これらの酵素センサは、酵素電極や白金電極等の電極と酵素固定膜とから構成され、酵素反応による物質変化を電極により電気信号の変化量として読み取ることにより、その酵素が特異的に作用する基質の濃度を測定するものである。例えば、グルコースセンサなどでは、下記式に従い生成または消費される過酸化水素、酸素等の電極活性な物質を電極でモニターして、生体基質濃度を測定する。

【0003】

【化1】



【0004】ところが、このような原理に基づく酵素センサには次のような問題点がある。基質が反応するためには化学量論的な酸素を必要とするが、実際の測定において、例えばグルコースセンサで糖尿病患者の血中グルコース濃度を測定する場合、体液中の溶存酸素量では不足である。そのため、試料血液を希釈したり、何らかの方法で酸素を補給することが必要である。また、過酸化水素を電気的にモニターする場合、アスコルビン酸のような還元性物質により測定誤差を生じるため、これら誤差を取り除くためには何らかの手段を講じる必要がある。さらに、従来のセンサは酵素固定膜を酸素電極や過酸化水素電極に装着することが必要であるため、微小化にも限界がある。

【0005】一方、これらの問題点を解決するため、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する酵素電極として、

導電性高分子を利用した酵素電極および電子メディエーターを利用した酵素電極が提案されている。しかし、導電性高分子を利用した酵素電極では、溶存酸素の影響を受けないという利点はあるが、応答性が低く、応答時間が長い等の問題がある。さらに、電解重合時に重合膜中に酵素を捕捉するという手法を取る場合は、固定化される酵素量を制御することは難しく、また酵素電極として利用する際、酵素の脱離による経時的な基質応答性の低下は避けることができない。また、電子メディエーターを利用した酵素電極でも電導度が低く応答性、応答時間の点で不十分である他、電子メディエーターをカーボンペースト中に分散させた形態をとるため、電子メディエーターの溶出、脱離に伴う経時的な応答性の低下という問題を有する。

【0006】ところで、このような酵素電極を用いて実際に生体試料中の特定成分を定量する場合、高精度に測定することはもちろん、試料液の希釈、攪拌等の操作を必要とせず、簡易にかつ迅速に測定できることが望ましい。また、血液等の試料の場合、使用できる試料の量に制約があることが多く、微量試料での測定が望まれる。従来の酵素電極においては、簡易かつ迅速に、また微量の試料でも正確な測定を長期にわたり行えるものはなかった。

【0007】そこで、本発明者は、これら従来の酵素電極の欠点を解決するものとして、先に、導電性基体表面に有機電荷移動錯体結晶を含有する導電層を設けた酵素電極を提案した（特願平2-24484号）。この酵素電極は、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する方式をとることにより、溶存酸素の影響を受けず、また妨害物質の影響も少ないという利点に加え、経時安定性に優れ、長期にわたり高精度な応答を与えることができるという利点を有する。また、本発明者はこの酵素電極においてさらに改善を重ね、酵素反応に伴う電子移動を効率的に行うことができ、より応答性が向上した酵素電極も提案した（特願平3-7908号、特願平3-86884号）。さらに、有機電荷移動錯体結晶を導電層に含有する酵素電極を用いて微小化したバイオセンサを作製することにより、試料液の希釈、攪拌等の操作を必要とせず、微量試料での測定を可能にした（特願平4-11346号）。しかしながら、このようなバイオセンサを在宅自己血糖値管理等の分野に応用する場合、さらに改良が望まれる。というのは、患者の負担を考えると一度の採血量をできるだけ少なく（例えば、数μl程度）することが望ましく、そのためにはセンサに滴下する血液量が極微量であっても測定でき、また血液量の多少による誤差が少ないことが必要である。

【0008】また、測定試料としては、採血したままの全血を使用できれば簡便である。その場合、血液中のタンパク質、赤血球等が電極表面に吸着することによって測定値に誤差を生じる恐れがある。従って、このような

試料中に含まれる妨害物質の影響を排除することが望まれる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有機電荷移動錯体を含有する酵素電極を用いて、試料液の希釈、攪拌を必要とせず微量試料での測定を可能としたバイオセンサにおいて、さらに微量の試料でも精度よく測定することができ、また試料をそのまま使用してもタンパク質等の妨害物質による誤差の少ないバイオセンサを提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、有機電荷移動錯体を電極材料として利用し、酵素および電子メディエーターを固定化した酵素電極と、その近傍に配置した対極からなる電極系において、少なくとも測定極上に、保液層を設けることにより液量による影響が少なく極微量の試料でも測定しうること、および濾液層を設けることに生体試料中の妨害物質による誤差を少なくすることができることを見出し、本発明を完成させた。さらに、濾液層や保液層を設けたバイオセンサにおいて、粘性の高い血液を速やかに酵素固定化膜に到達させ迅速な測定を行うには、これらの層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させればよいことも見出した。

【0011】本発明は、有機電荷移動錯体結晶を導電層として含む電極に酵素および電子メディエーターを固定化した測定極と、その近傍に設けた対極からなる電極系を有するバイオセンサにおいて、測定極上あるいは測定極を含む電極系上に濾液層および／または保液層を設けたことを特徴とするバイオセンサ、を要旨とする。

【0012】さらに、上記バイオセンサにおいて濾液層および／または保液層に抗血凝固剤を担持させたバイオセンサにも関する。これらのバイオセンサには、酵素が固定化されない補償極を設けてもよい。また、本発明では特に酵素が酸化還元酵素である場合に好適である。

【0013】

【作用】本発明のバイオセンサは、少なくとも測定極とその近傍に設けた対極とを有し、さらに測定極または測定極と他の電極部分を濾液層および／または保液層で覆った構造である。さらに、本発明のバイオセンサでは濾液層および保液層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させてもよい。また、酵素が固定化されていない補償極を設けて、試料中のタンパク質等の吸着、副反応の影響を除き、より高精度での測定を行うこともできる。

【0014】測定極は、導電性基体上に有機電荷移動錯体結晶を含有する導電層を形成させ、酵素と電子メディエーターの両者を固定化したものである。有機電荷移動錯体結晶は導電性基体上の絶縁性高分子フィルム内に成長させたものであってもよいが、導電性基体上に直接形成させたものが好ましい。

【0015】有機電荷移動錯体結晶を絶縁性高分子フィルム内に成長させて導電層を形成するには、例えば、導電性基体上に、電子供与体層を設け、その上にポリエチレンビニルブチラール、ポリエステル、ポリアミド、ポリエステルアミド等の絶縁性高分子の被膜を設け、これを有機電子受容体を含有する溶液と接触させる方法がある。この導電層に酵素、あるいは酵素と電子メディエーターを固定化して酵素電極を得る。

【0016】導電性基体の表面に直接形成させた有機電荷移動錯体結晶からなる導電層は以下に示す方法等により、厚さ方向に結晶を成長させて容易に得ることができ、厚さ方向に良好な導電性を有するものである。導電性基体としては、銅、銀、白金、金等の金属やカーボン電極の他、これらの導電性材料からなる導電層を蒸着等の手段により表面に設けた基体、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成した基体等が使用できる。

【0017】ここで、有機電荷移動錯体（以下、有機CT錯体と称する）とは、有機電子受容体と電子供与体とから、両者の間の電荷移動反応に伴い形成される化合物である。この有機CT錯体の形成に用いる有機電子受容体としては、特に制限されないが、シアノメチレン官能基を有する化合物が好ましく、中でもジシアノメチレン官能基と、キノンあるいはナフトキノン骨格とを有する化合物が好適である。このうちでも特に、7,7',8,8'-テトラシアノキノジメタン(TCNQ)はCT錯体形成能が強く、得られる有機CT錯体の電気伝導度が高いため応答時間、応答性で有利である。また工業的にも比較的入手が容易であることから好適である。

【0018】有機CT錯体の形成に用いる電子供与体としては、使用する有機電子受容体と、導電性を有するCT錯体を形成しうるものであれば、特に制限されるものではなく、有機、無機のいずれでもさしつかえない。具体的には、無機材料としては銅、銀、コバルト、ニッケル、鉄、マンガンなど、また有機材料としては、テトラチアフルバレン、テトラセレンフルバレン等のテトラセン類、及びその誘導体、あるいは2,2'-ビスピリジニウム、N-メチルフェナジニウム等、公知の電子供与体を使用することができる。

【0019】有機CT錯体結晶を成長させるには、液相および気相中での公知の方法を使用できる。液相中で有機CT錯体結晶を成長させる方法には例えば以下の方法がある。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等の基体の一部ないしは全部を、有機電子受容体を含有する溶液と接触させる。これにより、溶液中の有機電子受容体は、基体の表面を構成する電子供与体との間でCT錯体化反応を起こし、錯体が成長する。

【0020】有機電子受容体含有溶液の調製に使用する溶媒としては、極性のある非プロトン溶剤、例えばアセ

トトリル、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、メチルエチルケトン等が好適である。この溶液における有機電子受容体の濃度は、溶剤100重量部に対して通常0.01重量部～飽和濃度、好ましくは0.1重量部～飽和濃度が適当である。

【0021】有機CT錯体の形成は、通常、10～30℃の温度で行うが、用いる有機電子受容体と基体表面の電子供与体の組み合わせによっては、CT錯体化反応が急激に進み、緻密で均一な目的層が得にくい場合がある。そのような場合は、必要に応じて溶液、基体、雰囲気温度を下げたり、溶液の濃度を低くすればよい。また逆に、錯体化反応が遅く、有機CT錯体結晶が必要な厚みに成長するのに長時間を要する場合は、必要に応じて、加熱することができる。

【0022】有機電子受容体含有溶液の接触時間は、用いる有機電子受容体と電子供与体との組み合わせや目的とする導電層の厚みに大きく依存するが、一般に10秒から1時間程度である。気相成長法としては一般に真空蒸着法を用いることができる。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等を、減圧下（ $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-7}$ torr）に設置し、錯体結晶を成長させたい部分を適当な温度（100～300℃）に加熱保持する。次に、電子受容体を徐々に加熱し、気化させる。これにより、基体表面に到達した電子受容体分子と、基体表面の電子供与体との錯体化反応により錯体が成長する。この際、導電層の厚みは基体温度、電子受容体の気化速度等により容易に制御することができる。

【0023】このような液相法あるいは気相法により作成した有機CT錯体は、一般に微細な針状結晶となり、基板面に対して垂直方向に成長する。この有機CT錯体からなる導電層の厚みは特に制限されるものではないが、通常0.01～50μmの範囲であり、好ましくは0.1～10μmである。

【0024】上述の如く、導電層はその厚み方向に成長した微細な針状結晶からなり、そのため導電層の表面は微細な凹凸を有する構造となる。従って、後述の酵素や電子メディエーターの固定化の際には、酵素や電子メディエーターをこの微細な凹部に捕捉することができ、それらの固定化が容易となる。また、微細な針状結晶であるため電極部の実際の表面積を広くとることができ、その結果、酵素および電子メディエーターの固定化量を増大させ、酵素電極の出力として得られる電流密度を大きくすることが可能となる。

【0025】この導電層の厚みが上記範囲以下で薄すぎる場合、十分な表面積を得ることができず、その結果出力電流値が小さくなる。また、逆に上記範囲を超えて厚すぎる場合は、導電層自体の抵抗値が大きくなる。従って、酵素電極として使用する場合、電圧印加の際、電極

表面での電圧降下を起こすことになる。また、この有機CT錯体自体、力学的な強度は大きくないため、厚すぎると構造的な欠陥を生じやすくなる。

【0026】導電層は必要に応じ、洗浄、乾燥し、次いで導電性基体と導電層からなる電極に、水不溶性高分子を用いて酵素および電子メディエーターを導電層に接するように固定化する。あるいは、使い捨て等、再利用性が要求されない場合には、この水不溶性高分子を使用することなく酵素および電子メディエーターを固定化してもよい。

【0027】酵素は、対象とする物質や目的とする化学反応に応じ、酵素の基質特異性及び反応特異性を考慮して適宜選択することができる。使用しうる酵素は、特に制限されないが、例えばグルコースオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ペニシリナーゼ等が挙げられる。また、酸化還元酵素と補酵素との組み合わせも可能である。

【0028】使用する電子メディエーターは、酵素反応に伴う電子移動を効率よく行うことができる、すなわち、酵素から有機CT錯体への電子移動をスムーズに行わせるものであればよい。例えば、酸化酵素により基質を酸化する反応の場合は、還元型となった酵素から容易に電子を受取り、電子メディエーター自身は還元型となり、かつ導電層表面での電極反応により電子を電極へ供与し、酸化型に戻る性質を有するものである。このような電子メディエーターとしては、フェロセン、1,1'-ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸、フェロセンカルボキシアルデヒド等のフェロセン誘導体、ハイドロキノン、クロラニル、ブロマニル等のキノン類、フェリシアンイオン、オクタシアノタングステン酸イオン、オクタシアノモリブデン酸イオン等の金属錯体イオン等が好適である。

【0029】有機CT錯体からなる導電層に、水不溶性高分子を用いて、酵素および電子メディエーターを固定化する方法としては次のような方法が可能である。

(1) 前記導電層上に酵素および電子メディエーターを含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素および電子メディエーターからなる中間層および水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

(2) 前記導電層上に酵素および電子メディエーターを含む水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素および電子メディエーターを含む水不溶性高分子被覆層からなる2層を設ける。

(3) 前記導電層上に酵素を含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで電子メディエーター、あるいは電子メディエーターと酵素を含有する水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素からなる中間層、および電子メディエーターあるいは電子メディ

エーターと酵素を含む水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

(4) 前記導電層上に電子メディエーターを含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで酵素あるいは酵素と電子メディエーターとを含有する水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、電子メディエーターからなる中間層、および酵素あるいは酵素と電子メディエーターとを含む水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

【0030】酵素および電子メディエーターの固定化は、上記方法が簡便で好適であるが、これらに限定されることなく、公知の共有結合法、イオン結合法、吸着法、包括法、架橋法等を用いることも可能である。

【0031】水不溶性高分子としては、容易に均一に成膜することができ、酵素、電子メディエーターを均一に分散固定し、かつ酵素電極として使用する際、試料溶液中で溶解、膨潤して酵素、電子メディエーターの溶出による出力の低下を招くことのないものであれば限定されることなく使用できる。さらに、導電層中にピンホールが生じていると酵素電極として使用する際、基体あるいは電子供与体の試料溶液中への溶出の可能性があるが、水不溶性高分子層はピンホール部を覆うことにより溶出を防止する。

【0032】このような水不溶性高分子には、ポリビニルブチラール、ポリエステル、ポリアミド、ポリエステルアミド等の熱可塑性ポリマーが例示でき、これらの1種または2種以上を使用することができる。酵素、電子メディエーターの固定方法に応じ、また基質の拡散性等を考慮して適宜ポリマーを選択することができるが、例えばポリマービニルブチラールは水不溶性でありながら親水性、吸水性を有し、しかも非常にミクロなポアを有するため好適である。

【0033】酵素および電子メディエーターを含有する水不溶性高分子で導電層を被覆するには、水不溶性高分子を適当な有機溶剤で溶解させた溶液中に、酵素および電子メディエーターを溶解もしくは均一に分散させ、これを導電層に直接塗布、乾燥させることにより行うことができる。酵素、電子メディエーターを分散させて使用する場合は、水不溶性高分子が析出しない範囲で、酵素、電子メディエーターの良溶媒である水等を適宜添加すると酵素、電子メディエーターの分散、溶解性を向上させて固定化を効率的に行える。得られた酵素電極は、純水あるいは緩衝液等で洗浄して、完全に固定化されていない酵素、電子メディエーターを取り除いた後、使用に供することができる。また、この酵素電極をさらに電子受容体溶液に浸漬する等の手段で有機CT錯体を成長させておけば、膜全体の導電性を高め、大きい応答電流が得られる点で有利である。

【0034】上記のように、酵素および電子メディエーターを含有する水不溶性高分子で導電層を被覆する場

合、酵素から有機CT錯体、酵素から電子メディエーター、あるいは電子メディエーターから有機CT錯体のへのスムーズな電子移動性を確保して応答性をよくするには、固定膜は薄い方がよい。例えば10Å~10μm好ましくは100Å~1μmである。また必ずしも均一な膜である必要はなく、酵素と有機CT錯体、酵素と電子メディエーター、あるいは電子メディエーターと有機CT錯体が直接接触するようにすればよい。

【0035】また、水不溶性高分子で、酵素および電子メディエーターからなる中間層を被覆する場合は、酵素と基質との接触、および残存しているピンホールの被覆を考慮して0.01~10μm好ましくは0.1~5μm程度の厚さとすることが望ましい。こうして得た酵素電極は、導電性基体上に設けた導電層上に酵素と電子メディエーターが接触するように固定した構造であり、従来の過酸化水素電極、酸素電極等に比べ構造的に簡単であり、小型化が可能である。また、有機CT錯体結晶からなる導電層は、酵素との間で電子移動が容易であるのみならず、従来電子メディエーターとして使用されていたフェロセン類等と比較して、その結晶層の電気伝導度は著しく大きい。これは、これら有機CT錯体が発達した針状結晶を構するため、同じ含有量でも膜中の導電パス数が多くなり、電子移動に有効に寄与するためと考えられる。また、導電層表面に電子メディエーターが固定化されているため、有機CT錯体と酵素が接触しているにもかかわらず構造的に電子移動が起こりにくい部分においても、スムーズな電子移動性を確保し、応答性を向上させることが可能となる。また、有機CT錯体結晶をポリマーを用いずに導電性基体上に直接成長させると、針状結晶の微細な凹凸表面が得られるため、導電層に直接接触する酵素や電子メディエーターの量を多くすることができ、酵素電極の応答性をより一層高めることができる。

【0036】対極は、測定極あるいは補償極に一定電位を印加した時、それらの電極での電流が支障なく流れるようにするため、電極自身の抵抗が小さく、なるべくそれ自身が測定試料中で分極せず、また対極での反応生成物が測定極での反応を妨害したり、それ自身が反応することのない特性を有するものを使用する。このような観点から、白金、金、銀、銅等の金属や、カーボン電極の他、これらの導電性材料からなる導電層を蒸着、スパッタ等の手段により基体表面に設けたり、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成することにより得たものが対極として使用できる。また、例えば銀を使用する場合、アノード分極等の手段によりその表面にAgClを析出させ、溶液中で電気化学的に安定にするのも好ましい。

【0037】対極と測定極は種々の形状で設けることができるが、製造コスト、工程の簡便さ、測定に必要とする試料の容量等の観点から、同一平面上に設ける方法が好適である。同一支持体上に設ける場合は、例えばガラ

ス板、樹脂板、樹脂フィルム等の非導電性支持体上に、銅、銀、金、水銀等の金属層を蒸着、スパッタ等により形成し、測定極における導電性基体および対極とする。また、測定極において導電性基体上に直接形成させる有機CT錯体を、同様にして対極上にも成長させ、これに対極として使用してもよい。この場合、測定極と対極とを同一支持体に配置した構造においては、測定極の有機CT錯体を成長させる工程において同時に対極を作製することができ、工程が簡便であるという利点がある。

【0038】補償極は、電極自身の抵抗が測定極の抵抗と同程度であり、試料液中のタンパク質、電解質、生体成分等と特異的に反応せず、測定極における酵素反応以外の電気化学的副反応や吸着による影響を同程度に受けるものであれば、特に制限されるものではないが、その形状は電流値の補償を行うという目的から、同一形状か少なくとも同一面積であることが好ましい。電極系を同一支持体に設ける場合、酵素を固定化する以外は測定極の作製と同時にかつ同様に補償極を作製することができる。例えば、測定極において導電性基体上に直接有機CT錯体を形成させる工程、および水不溶性高分子を塗布する工程において同時に補償極を作製することができ、工程が簡便になる。

【0039】なお、本発明のバイオセンサを用いた測定では、参照電極を使用せずに行うことが可能である。このような場合、対極の面積は測定極の面積の2倍以上、好ましくは10倍以上であることが望ましい。これは、測定時に印加する電位差が主に測定極にかかるようにすることにより、高精度に定量するためである。

【0040】本発明のバイオセンサでは、上記のようにして得た電極系上にさらに濾液層および/または保液層を設ける。濾液層は試料中の比較的大きい妨害物質による影響を少なくする目的で設ける。また保液層は微量の試料を保持し、かつ均一に拡散させるために設ける。これらはそれぞれの目的のために単独で設けてもよいが、両層を同時に設けるのが好ましい。また、濾液層および/または保液層は、少なくとも測定極を覆うように設置すればよく、測定極のみ、あるいは測定極と対極を覆う。補償極を設ける場合はさらに補償極を覆ってもよい。また濾液層および保液層の両方を設ける場合は、電極上に保液層次いで濾液層の順に設けるのが好ましい。

【0041】保液層としては、微量の供給試料に対して吸収性があり、試料を電極系上に一様に拡散することができるものを使用する。このような観点から、水溶液系の生体試料の場合には吸水性高分子が好適であり、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、メチルセルロース、デンプン系あるいはアクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系もしくは無水マレイン酸系のポリマーが好適である。これらの高分子物質は容易に水溶液とすることができ、適当な濃度の水溶液を電極上に塗布、乾燥することにより必要な厚さの薄膜を

形成しうる。また、レーヨン等の親水性不織布を用い、毛細管現象を利用して供給試料を電極まで供給することも可能である。親水性不織布を用いる場合は、親水性粘着剤で貼付したり、機械的に設置したりする方法で電極上に設ける。保液層の厚さは0.1～10 μm 程度である。

【0042】濾液層は、供給する試料中に含まれる細胞、赤血球、タンパク質等の比較的大きな妨害物質の電極表面上への拡散を抑止し、なおかつ測定対象となる基質を透過させる機能を有するものである。このような機能を有する材料としては、ポリカーボネート、セルロースアセテート、ナイロン不織布、レーヨン、セラミックス等の多孔体が好適であり、その孔径が通常0.001 μm ～10 μm 、好ましくは0.01 μm ～1 μm のものを使用する。濾液層の形成は、電極上あるいは保液層の上に高分子物質の溶液を塗布、乾燥することにより行うか、あるいは多孔体の薄膜を機械的に密着させる等の方法で設置することにより行うことができる。

【0043】濾液層および/または保液層を設けた本発明のバイオセンサは、濾液層または保液層上に試料を直接滴下して測定することができる。両層を設けた場合、濾液層で妨害物質が除去され保液層に浸透した試料は電極上で一様に拡散するため、微量の試料の場合でもそのまま使用して精度よく測定することができる。

【0044】濾液層および保液層には、これらの層の少なくとも1層中に抗凝固剤を担持させれば、測定試料として採血したままの全血を使用しても迅速、安定に測定ができる。血液は粘性が高く、電極に滴下後、濾液層あるいは保液層を通過して酵素固定化層に到達させ基質濃度に応じた出力電流を得るには1分以上を要していた。これは、血液が大気と接触した瞬間から凝固が始まり、徐々に増粘するためであると考えられる。抗凝固剤を用いると例えば15秒程度の短い時間で酵素固定化層に達し一定の出力電流値が得られる。使用する抗凝固剤としてはフッ化ナトリウムが安定で取扱も容易であるため好適であるが、その他、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸も使用でき、試料液の通過時間を短縮させ、迅速に応答電流が得られるという効果を発揮する。抗凝固剤を担持させる方法としては、濾液層や保液層を形成する際、その塗布溶液中に予め所定濃度に抗凝固剤を溶解もしくは分散させた溶液を用いる方法がある。

【0045】本発明のバイオセンサに電位を印加して酵素反応による応答電流を測定する際は、パルス電位を印加するのが好ましい。定常状態電流の印加では、電極の表面状態が目的以外の電気化学反応等により変化するので、測定誤差を生じやすくなる。パルス電位を印加すれば、このような電極の劣化を極力低減でき、安定化時間が短いことから好適である。また、補償極を設けたバイオセンサを用いた測定では、測定極と対極、および補償極と対極との間に連続して、あるいは同時に所定の電

位を印加し、それにより両電極間を流れる電流値を測定し、両者の間の電流値の差を酵素反応による応答電流として定量することができる。

【0046】本発明のバイオセンサでは、グルコース等の糖分、乳酸、アルコール等の血液や尿中の微量生体物質や、食品加工プロセスにおける糖分、アルコール分等を測定できる。従来のバイオセンサでは、測定時、希釈、攪拌する必要があったが、本発明のバイオセンサを用いれば、試料を希釈、攪拌することなくそのまま測定でき、上記のような物質を選択的に高精度で、しかも長期にわたって繰り返し分析することが可能である。

【0047】

【実施例】

【0048】

【実施例1】銅張りガラスエポキシ基板（松下電工製R-1701）をエッチングして図1に示す形状の測定極部（直径1.5 mm）および対極部を形成し、さらに全面を電解質銀めっきして電極とした。次に、電極部以外をエポキシ樹脂塗料をスクリーン印刷してモールドした。

【0049】対極部を0.1 M塩酸中で0.4 mA/cm²の電流密度で2分間アノード分極させ、表面に塩化銀を析出させた。

【0050】7,7',8,8'-テトラシアノキノジメタン（試薬、キシダ化学製、以下TCNQと略す）1.0gをアセトニトリル（試薬、スペクトル用）10mg中に加えてTCNQの飽和溶液を調製した。このTCNQ飽和溶液を2 μl 測り取り、室温下で上記電極の測定極部に滴下、自然乾燥した。この操作を計5回繰り返し、測定極部の全面に濃紫色の微細な針状結晶を有する有機CT錯体薄膜を形成させた。

【0051】グルコースオキシダーゼ（*Aspergillus niger*由来、Sigma 社製、Type VII）40mgを1 mlの1.0 Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した後、4 μlを測り取り、上記測定極部に塗布風乾した。

【0052】ポリビニルブチラル樹脂〔商品名：エスレックB、BX-L、積水化学工業（株）製〕1.0 gおよび1,1'-ジメチルフェロセン〔試薬、東京化成（株）製〕1.0 gをエチルカルビトール2.5 gに溶解して還元型メディエーターを含有する組成物とした。この組成物をスクリーン印刷機を用いて前記測定極部に印刷した後、80℃中10分間乾燥して約3 μmの厚みを有する還元型メディエーターを含有する層を形成した。

【0053】次に、前出のTCNQ溶液を1 μl 測り取り、上記測定極上に塗布、風乾させた後、純水で洗浄した。

【0054】カルボキシメチルセルロースの1重量%水溶液を5 μl 測り取り、測定極および対極上に塗布、乾燥して保液層を有するセンサを作製した。

【0055】図2に示す各グルコース濃度の0.1M KCl/67mM リン酸緩衝液試料5 μlを上記電極系に滴下したところ、保液層を通して試料が速やかに浸透し、測定極および対極の全面を覆った。そのまま室温で1分間放置し

た後、対極に対して0.25 Vのパルス電位を測定極に印加して、電位印加5秒後の電流値を測定することにより、各グルコース濃度に対する応答電流を測定した。図2に示すように、微量の試料滴下に対して良好な応答特性が得られた。

【0056】

【比較例1】保液層の形成（カルボキシメチルセルロース溶液の塗布、乾燥）を行わないこと以外は実施例1と同様して電極を作製し、同様にして測定したところ、5 μlの試料では電極系の全面を覆うことができず、測定できなかった。

【0057】

【実施例2】実施例1において、カルボキシメチルセルロース溶液の塗布、乾燥の代わりにポリカーボネートの塩化メチレン溶液を塗布、乾燥して濾液層を有するセンサを作製した。

【0058】上記電極系に、図2に示す各グルコース濃度の全血試料20 μlを滴下し、電極系の全面を試料液で覆った。そのまま、室温で1分間放置した後、対極に対して0.25 Vのパルス電位を測定極に印加し、印加5秒後の電流値を測定した。その結果を、図2に示す。

【0059】このように、全血試料滴下に対して、良好な応答特性が得られた。

【0060】

【比較例2】濾液層の形成（ポリカーボネート溶液の塗布、乾燥）を行わないこと以外は実施例2と同様して電極を作製し、同様にして各グルコース濃度に対する応答電流を測定したところ、図2に示す結果を得た。このように、濾液層を設けないと、濾液層を設けた場合に比べ、感度は低下し応答の直線性も劣った。これは、試料中のタンパク質、血球成分等が電極表面に吸着したためと考えられる。

【0061】

【実施例3】実施例1と同様にして、図3に示す形状の、測定極、対極および補償極を有する電極パターンを作製し、導電性有機CT錯体薄膜を形成した後、測定極部のみに酵素溶液を塗布した。

【0062】TCNQ 5.0gを300 mlのアセトン中に室温で懸濁させ、これにTCNQと当量のジメチルフェロセンのアセトン溶液を徐々に滴下し、さらに2時間攪拌した後、濾過、乾燥してジメチルフェロセン-TCNQ錯体を得た。

【0063】ポリビニルブチラル樹脂を1.0 g、上記ジメチルフェロセン-TCNQ錯体を0.7 g、TCNQを0.3 g 測り取り、2.5 gのエチルカルビトールを加え、乳鉢で良く混練して酸化型メディエーターを含有する組成物を作製した。これを実施例1と同様にして、スクリーン印刷法により測定極部および補償極上に印刷、乾燥して、厚み約4 μmの酸化型メディエーターを含有する層を両電極上に作製した。

【0064】さらに、測定極を含む電極系の全面に、保

液層として3重量%のポリビニルアルコール水溶液を塗布、乾燥した後、濾液層として酢酸セルロースのアセトン溶液を塗布、乾燥してセンサを作製した。

【0065】上記電極系に、図4に示す各グルコース濃度の全血試料5 μ lを滴下し、保液層を通して電極系の全面を試料液で覆った。そのまま室温で1分間放置した後、対極に対して0.25Vのパルス電位を測定極に印加し、印加5秒後の電流値を測定した。引き続き、対極に対して0.25Vのパルス電位を補償極に印加し、同様に印加5秒後の電流値を測定した。測定極および補償極で得られた両者の電流値の差を応答電流とした。図4に示す結果より、本発明のバイオセンサでは微量の試料滴下に対して良好な応答特性が得られたことが明らかである。

【0066】

【実施例4】実施例3で作製した酸化型メディエーターを含む組成物4.5gに1.0gのグルコースオキシダーゼを混合し、三本ロールにより混練し、酵素および酸化型メディエーターを含む組成物とした。

【0067】このようにして得られた組成物を、実施例3と同様にして作製した導電性有機CT錯体薄膜からなる測定極および補償極上に、同様にスクリーン印刷法により印刷塗布、乾燥することにより、酵素および酸化型メディエーターを含む厚み約5 μ mの層を形成した。

【0068】さらに、測定極を含む電極系の全面に、保液層として3重量%のポリビニルピロリドン水溶液を塗布、乾燥した後、濾液層としてナフィオンのアルコール溶液(試薬、Aldrich製)を塗布、乾燥してセンサを作製した。

【0069】実施例3と同様にして測定した結果を図4に示す。このように、本発明バイオセンサは良好な応答特性を示した。

【0070】

【実施例5】実施例1においてカルボキシメチルセルロースの水溶液を測定極および対極上に塗布する際に、カルボキシメチルセルロースを1重量%およびフッ化ナトリウムを2重量%含む水溶液を使用し、それ以外は実施例1と同様にしてセンサを作製した。得られたセンサの電極系上に、グルコース濃度10mMの全血試料5 μ lを滴下したところ、保液層を通して速やかに浸透し、測定極上および対極の全面を覆った。そのまま室温で所定時間放置した後、対極に対して0.25Vのパルス電位を測定極に印加して、電位印加5秒後の電流値を測定した。このバイオセンサを使用した場合、室温での放置時間が15秒以上においてほぼ一定の出力電流が得られた。実施例1では約1分間の放置時間が必要であるのに対し、本実施例のバイオセンサでは微量の全血試料滴下に対して非

常に迅速に応答特性が得られた。

【0071】

【実施例6】実施例3においてポリビニルアルコール水溶液を電極系上に塗布する際に、3重量%のポリビニルアルコールおよびヘパリン2重量%を含む水溶液を使用し、それ以外は、実施例2と同様にしてセンサを作製した。得られたセンサの電極系に、グルコース濃度20mMの全血試料5 μ lを滴下し、保液層を通して電極系の全面を試料液で覆った。そのまま室温で所定時間放置した後、対極に対して0.25Vのパルス電位を測定極に印加して、電位印加5秒後の電流値を測定した。引き続き、対極に対して0.25Vのパルス電位を補償極に印加し、同様に印加5秒後の電流値を測定した。測定極および補償極で得られた両者の電流値の差を応答電流とした。このバイオセンサを使用した場合、室温での放置時間が30秒以上においてほぼ一定の出力電流が得られた。実施例3では約1分間の放置時間が必要であるのに対し、本実施例のバイオセンサでは微量の全血試料滴下に対して非常に迅速に応答特性が得られた。

【0072】

【発明の効果】本発明のバイオセンサにおいては、少なくとも測定極上に保液層を設けることにより微量の試料であっても有効に保持することができ、液量の多少による測定誤差が少ない。また、濾液層を設けることにより、全血等の生体試料をそのまま用いても、それに含まれる蛋白質や血球成分の吸着等による妨害を受けることなく、高濃度基質まで良好な応答性を有する。従って、高精度の測定を簡便に行うことができ、在宅自己血糖値管理等に有用なバイオセンサを提供できる。また、保液層および濾液層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させれば、全血等の生体試料に対しても迅速、高精度の測定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明バイオセンサの一例を示す図である。

【図2】実施例1および比較例2で測定したグルコース濃度と応答電流の関係を示す図である。

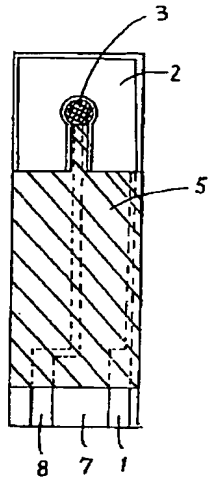
【図3】本発明バイオセンサの他の例を示す図である。

【図4】実施例2および実施例3で測定したグルコース濃度と応答電流の関係を示す図である。

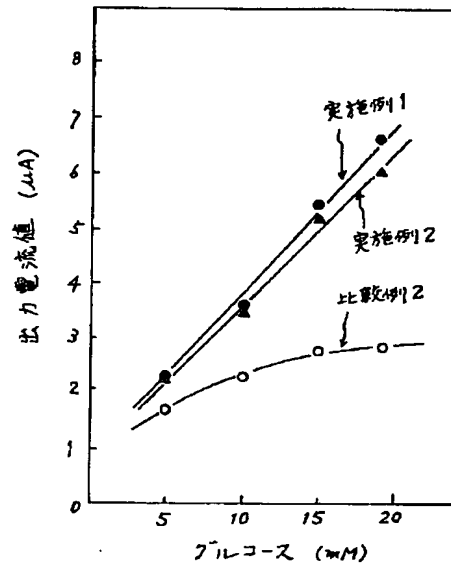
【符号の説明】

- | | |
|-----------|----------|
| 1: 基板 | 2: 対極 |
| 3: 測定極 | 4: 補償極 |
| 5: エポキシ樹脂 | 6: リード部 |
| 7: 対極端子 | 8: 測定極端子 |
| 9: 補償極端子 | |

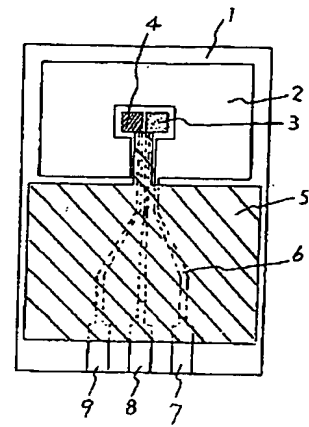
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

